

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-196268

(43)Date of publication of application : 06.08.1996

(51)Int.Cl.

C12N 1/38
//(C12N 1/38
C12R 1:01)
(C12N 1/38
C12R 1:23)
(C12N 1/38
C12R 1:245)

(21)Application number : 07-009311

(71)Applicant : LOTTE CO LTD

(22)Date of filing : 24.01.1995

(72)Inventor : YOSHIYAMA MASAOKI
SHIMURA SUSUMU
ITOU YOSHIO
KUBO NAOKI
ITO MASANORI
KAMIWAKI TATSUYA

(54) GROWTH PROMOTER FOR LACTIC ACID BACTERIA

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject substance, containing an extraction residue of cacao beans and/or cacao husks which are their periderms or a water extract of the residue as an active ingredient, capable of promoting the selective growth of lactic acid bacteria and useful for forming enteral floras predominant in useful microorganisms. CONSTITUTION: This substance contains an extraction residue after extracting cacao beans and/or cacao husks with an organic solvent having compatibility with water or a water extract of the residue as an active ingredient. Although the extraction residue or water extract has promoting actions on growth of lactic acid bacteria of the genus Bifidobacterium or Lactobacillus, the fraction having - 10000 molecular weight of the water extract has especially great promoting effects on the growth of the lactic acid bacteria.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

11.12.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3522373

[Date of registration]

20.02.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平 8 - 1 9 6 2 6 8

(43)公開日 平成 8 年 (1 9 9 6) 8 月 6 日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 1/38		8828-4B		
//(C12N 1/38				
C12R 1:01)				
(C12N 1/38				
C12R 1:23)				

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平 7 - 9 3 1 1	(71)出願人	3 9 0 0 0 2 9 9 0 株式会社ロッテ 東京都新宿区西新宿 3 丁目 2 0 番 1 号
(22)出願日	平成 7 年 (1 9 9 5) 1 月 2 4 日	(72)発明者	吉山 正章 群馬県高崎市東町 2 6 6 - 1 3 リバーサイド松村 2 0 2
		(72)発明者	志村 進 埼玉県浦和市沼影 1 - 2 3 - 6
		(72)発明者	伊東 禧男 東京都清瀬市野塩 3 - 2 6 - 1 1
		(74)代理人	弁理士 浜田 治雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乳酸菌増殖促進物質

(57)【要約】

【目的】 ヒトに有益な腸内細菌であるビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属に属する細菌の増殖を促進し、有益菌が優勢な腸内フローラを形成する乳酸菌増殖促進物質を提供する。

【構成】 カカオ豆および／またはカカオ豆の外皮であるカカオハスクの溶媒抽出残渣または該残渣の水抽出物を有効成分とする。

【効果】 本発明乳酸菌増殖促進物質はビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属に属する細菌に対して選択的に増殖を促進する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カカオ豆および／またはカカオ豆の外皮であるカカオハスクの溶媒抽出残渣または該残渣の水抽出物を有効成分とする乳酸菌増殖促進物質。

【請求項 2】 溶媒が水と相溶性のある有機溶媒である請求項 1 に記載の乳酸菌増殖促進物質。

【請求項 3】 水抽出物のうち分子量 10000 以下の成分を有効成分とする請求項 1 または 2 に記載の乳酸菌増殖促進物質。

【請求項 4】 増殖する乳酸菌がビフィドバクテリウム属またはラクトバチルス属の菌である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の乳酸菌増殖促進物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒトに有益な腸内細菌であるビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属に属する細菌の増殖を促進し、有益菌が優勢な腸内フローラを形成する物質に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒトの腸内には数多くの細菌が常在し、複雑な腸内フローラを形成している。

【0003】 この腸内フローラを構成する細菌のうち、ビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属等の乳酸菌は、ビタミンの合成、外来病原菌の感染防御、免疫機能の増強等、ヒトに有益な働きをすることが知られている。

【0004】 一方、クロストリジウム・パーFRINGENS 等はアンモニア、インドール等の腐敗産物や細菌毒素を産生し、大腸ガン、動脈硬化、高血圧、肝臓障害、老化等の原因となる。ヒトが健康を維持して行くためには、腸内フローラをビフィズス菌に代表される有益菌が優勢な状態に維持することが重要である。

【0005】 このような観点から、これまでに腸内有益菌の代表であるビフィズス菌を増殖させる物質が数多く見出されている。例えば、ジャガイモ乾燥物（特開平 6 - 217733 号公報）、コーヒノキ属植物の葉の抽出物（特開平 6 - 125771 号公報）、夕顔果実から抽出したシラップ状物質（特開平 2 - 135088 号公報）、ウコギ科植物の溶媒抽出物（特開平 2 - 249482 号公報）、大豆の脂溶性成分抽出残渣のアルコール類水溶液抽出物（特開昭 62 - 155082 号公報、特開昭 60 - 66978 号公報）および大麦蛋白質含有物質の酵素分解物（特開昭 61 - 282070 号公報）等が挙げられる。

【0006】 しかしながら、これらの物質は効果が不十分であったり、乳酸菌以外の所望外の細菌類の増殖も促進してしまう等の問題がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の課題は乳酸菌に対して選択的に増殖促進を行い、有益菌が優

勢な腸内フローラを形成する物質を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、種々研究の結果、カカオ豆、特にその外皮であるカカオハスクに、ビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属に属する乳酸菌を増殖させる物質が含まれていることを見出し、さらにその物質を乳酸菌に選択的に効果を示す増殖促進剤として抽出することに成功して本発明を完成した。これまでカカオ豆に乳酸菌の増殖を促進させる物質が含まれていることは全く知られておらず、本発明者等により初めて見出されたものである。

【0009】 即ち、本発明はカカオ豆および／またはカカオハスクの溶媒抽出残渣または該残渣の水抽出物を有効成分とする乳酸菌増殖促進物質である。

【0010】 カカオ豆はその全体を利用することができるが、本発明の実際において、カカオ豆の外皮であるカカオハスクを使用するのが従来不要物として扱われていたものの有効利用の見地からも望ましい。これらカカオ豆およびカカオハスクは生のものの他に、加熱したものをを用いることができる。

【0011】 このカカオおよび／またはカカオハスクを水と相溶性のある有機溶媒で抽出後に得られる残渣または該残渣を水で抽出し、次いで水分を留去して本発明の目的物である水抽出物を得る。

【0012】 抽出に用いる水と相溶性のある溶媒としては、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、アセトン等の有機溶媒、酢酸エチル、酢酸メチル等のこれらの誘導体、これらの 2 種以上の化合物、例えばアセトンアルコールおよびこれらの 2 種以上の混合物等の極性溶媒が挙げられる。ヘキサン、エーテル等の非極性有機溶媒や水では、本発明の目的物である乳酸菌増殖促進物質が殆ど得られない。

【0013】 本発明の目的物は前記水と相溶性のある有機溶媒での抽出残渣に大部分が含まれており、カカオおよび／またはカカオハスクを有機溶媒で抽出して得る抽出物はカカオ豆特有の強い匂いを有しているが、乳酸菌増殖促進効果は殆ど認められない。

【0014】 有機溶媒で抽出後の残渣を水で抽出することにより得られる水抽出物は、乳酸菌に対して強い増殖促進効果を示すが、他の腸内細菌に対しては殆ど増殖促進効果を示さない性質を備えている。また、カカオおよびカカオハスクに含まれている芳香物質は、有機溶媒で抽出されているので、得られる水抽出物は褐色で無臭の微粉末である。

【0015】 さらに本発明において、前記のようにして得られる水抽出物から限外濾過膜等の分離手段を用いて分子量 10000 以下の画分を採取し、これを有効成分としてもよい。即ち、前記水抽出物の分子量 10000 以下の画分には強い乳酸菌増殖促進効果が認められる

が、反面分子量 10000 を越える画分ではそれが非常に弱くなることが確認されている。

【0016】以下に、本発明の実施例を挙げて説明する。

【0017】

【実施例】

実施例 1

160℃で1時間加熱したカカオハスク1000gにエタノール2400gを加え、78℃にて1時間還流抽出した。このように処理した液を遠心分離により抽出液と残渣とに分離し、得られた残渣に水6100gを加え、40℃にて30分加温抽出して水抽出液を調製した。得られた水抽出液から水分を留去して褐色で無臭の水抽出物微粉末100gを得た。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは5.2であった。

【0018】実施例 2

エタノールの代わりにアセトンを用いる以外は、実施例1と同様にして褐色で無臭の水抽出物微粉末112gを調製した。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは5.2であった。

【0019】実施例 3

加熱していない生のカカオハスクを用いる以外は、実施例1と同様にして褐色で無臭の水抽出物微粉末107gを調製した。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは5.1であった。

【0020】実施例 4

160℃で1時間加熱したカカオ1000gを用いる以外は、実施例1と同様にして褐色で無臭の水抽出物微粉末133gを調製した。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは5.1であった。

【0021】実施例 5

加熱していない生のカカオ1000gを用いる以外は、実施例1と同様にして褐色で無臭の水抽出物微粉末125gを調製した。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは5.2であった。

【0022】比較例 1

実施例1において、遠心分離により得られた抽出液からエタノールを留去して褐色でカカオ豆特有の強い匂いを有するエタノール抽出物微粉末48gを得た。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは3.7であった。

【0023】比較例 2

160℃で1時間加熱したカカオハスク1000gに水6100gを加え、40℃にて30分加温抽出して水抽出液を調製した。得られた水抽出液から水分を留去して褐色でカカオ豆特有の強い匂いを有する水抽出物微粉末120gを得た。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは4.7であった。

【0024】比較例 3

160℃で1時間加熱したカカオハスク1000gにヘ

キサン2400gを加え、60℃にて1時間還流抽出後、ヘキサン抽出残渣に水6100gを加え、40℃にて30分加温抽出して水抽出液を調製した。得られた水抽出液から水分を留去して褐色で無臭の水抽出物微粉末127gを得た。この粉末を10倍量の水に溶解し、pHを測定した結果、pHは4.7であった。

【0025】試験例 1

実施例1～3と比較例1～3の6つの試料の、乳酸菌と他の腸内細菌の増殖に与える影響を調べた。

【0026】試験菌株をブリックスリバープロスで37℃にて48時間前培養後、生理食塩水で菌体を洗浄して6mlの生理食塩水に懸濁した。この菌懸濁液20μlを、被験物質が0.6%の濃度となるように添加した6mlの表1に示す組成の試験培地に接種し、37℃にて48時間嫌氣的に培養後、培養液のpHを測定して菌の増殖を調べた。増殖促進効果は被験物質を添加しない培地に菌を接種して同様に培養したものを対象とし、対照と比べてpHが0.1～0.5低下した場合に「弱い効果あり」；(+)、0.6～1.0低下した場合に「強い効果あり」；+、1.1～1.5低下した場合に「強い効果あり」；++と判定した。

【0027】

【表1】

試験培地組成

K ₂ HPO ₄	2.5g
乳糖	35.0g
酢酸ナトリウム	25.0g
バクトカザミノ酸 (ビタミンフリー)	5.0g
アラニン	200mg
Lシステイン	200mg
トリプトファン	200mg
アスパラギン	100mg
アデニン	10mg
グアニン	10mg
ウラシル	10mg
キサンチン	10mg
ニコチン酸	600μg
チアミン塩酸	200μg
リボフラビン	200μg
ピリドキシン塩酸	1200μg
葉酸	12.5μg
ビオチン	12.5μg
p-アミノ安息香酸	12.5μg
MgSO ₄ ・7H ₂ O	200mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	10mg
NaCl	10mg
MnSO ₄ ・5H ₂ O	10mg
純水	1リットル

pH 6.8

【0028】結果を表2に示すが、実施例1～3の水抽出物はビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属に属する多くの細菌の増殖を促進したが、他の腸内細菌

に対してはユーバクテリウム属の1株を除いて増殖を促進することはなかった。

【0029】

【表2】

カカオハスク抽出物の腸内細菌に対する増殖促進作用

供試菌株		被験試料					
		a	b	c	d	e	f
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	E-319	—	—	—	(+)	(+)	(+)
	A-234-4	—	—	—	(+)	(+)	—
	JCM 1255	—	—	—	—	—	—
<i>B. infantis</i>	S-12	—	—	—	+	+	(+)
	1-10-5	—	—	—	(+)	(+)	—
	JCM 1222	—	—	—	+	+	(+)
<i>B. breve</i> S-1	S-1	—	—	—	+	+	—
	S-46	—	—	—	+	+	+
<i>B. adreus</i>	E-2986	—	—	—	++	++	+
	E-319a	—	—	—	(+)	(+)	—
<i>B. longum</i>	M601	—	—	—	++	++	+
	M602	—	—	—	++	++	+
	JCM 1217	—	(+)	(+)	++	++	+
<i>Lactobacillus casei</i>	JCM 1134	(+)	(+)	(+)	++	++	+
	ATCC 7469	—	—	—	+	+	(+)
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356	—	—	—	(+)	(+)	—
<i>L. salivarius</i>	ATCC 11741	—	—	—	++	++	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	IF-20478	—	—	—	—	—	—
<i>Peptococcus palmaris</i>	1612	—	—	—	—	—	—
<i>Enterobacter aerofaciens</i>	JCM 7790	—	—	—	(+)	(+)	(+)
<i>E. limosum</i>	ATCC 8486	—	—	—	—	—	—
<i>Bacteroides distasonis</i>	JCM 117	—	—	—	—	—	—
	JCM 5825	—	—	—	—	—	—
	S-601	—	—	—	—	—	—
<i>B. thetaiotaomicron</i>	AS-126	—	—	—	—	—	—
<i>B. vulgatus</i>	S-601	—	—	—	—	—	—
<i>B. fragilis</i>	M-601	—	—	—	—	—	—
<i>Rikenella microfusum</i>	NCTC 11190	—	—	—	—	—	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 20	—	—	—	—	—	—
	JCM 1290	—	—	—	—	—	—
	ATCC 13124	—	—	—	—	—	—
<i>C. difficile</i>	JCM 1296	—	—	—	—	—	—
<i>C. butyricum</i>	ATCC 14823	—	—	—	—	—	—
<i>C. paraputrificum</i>	VPI 6372	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	JCM 1649	—	—	—	—	—	—
	F-604	—	—	—	—	—	—

a; 比較例1の水抽出物 b; 比較例2の水抽出物 c; 比較例3の水抽出物
d; 実施例1の水抽出物 e; 実施例2の水抽出物 f; 実施例3の水抽出物

【0030】このことから、実施例1の水抽出物は腸内細菌のうち有用菌であるビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属に属する乳酸菌を選択的に増殖させる効果を有することが示された。

【0031】これに対して比較例1のエタノール抽出物、比較例2および3の水抽出物は乳酸菌の増殖促進効果は殆ど認められなかった。この原因としてカカオハスクには乳酸菌に対する増殖促進物質の他に、増殖阻害物質も含まれており、これらの物質が水と相溶性のある有機溶媒で抽出することにより取り除かれるのではないか

と考えられる。

【0032】試験例2

本発明の乳酸菌増殖促進物質の酸および消化酵素に対する安定性を調べるために以下の試験を行った。なお、試験の概要を図1に示す。

【0033】実施例1の水抽出物の50% (w/w) 水溶液に濃塩酸を加えてpH2.0に調整し、37℃で1時間放置した(酸処理物)。その後酸処理物を2つに分け、一部は1gあたりペプシン(Diflico社製、製品番号0151-17)0.04mgを加えて37℃で

1 時間反応させた（ペプシン処理物）。残りのものは、NaOHでpH 7. 0に調整後、さらに2つに分けてそれぞれ1 gあたりアミラーゼ（Sigma社製、製品番号A-0521）1. 4 mg、リパーゼ（Sigma社製、製品番号L-3126）1. 7 mgを加え、て37℃で1時間反応させた（アミラーゼ処理物、リパーゼ処理物）。

【0034】上記4つの処理物と対照として実施例1の

カカオハスク水抽出物の酸および消化酵素に対する安定性

供試菌株	被験試料				
	ペプシン 処理物	酸 処理物	アミラーゼ 処理物	リパーゼ 処理物	実施例1の 水抽出物
<i>Bifidobacterium bifidum</i> E-319	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM 1217	++	++	++	++	++
<i>Bifidobacterium infantis</i> JCM 1222	+	+	+	+	+
<i>Bifidobacterium adrentis</i> E-2986	++	++	++	++	++
<i>Bifidobacterium breve</i> S-1	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Lactobacillus casei</i> JCM 1134	++	++	++	++	++

【0037】このことから、本発明の乳酸菌増殖促進物質は乳酸菌の生息場所である大腸まで活性を維持したまま到達するものと考えられる。

【0038】試験例3

年齢22～33歳の健康な成人男女8名を被試者として実施例1の水抽出物0. 8 gを朝、昼、夕食後連続14日間経口摂取させた。この間、摂取開始直前（0日目）、摂取開始1週間後（7日目）、摂取開始2週間後（14日目）、摂取終了後2週間目（28日目）に各人の糞便を採取し、光岡の方法（光岡知足著「腸内菌の世界」、叢業社、東京、p53～65）に従い、腸内菌叢の検索を行った。

【0039】8名平均の腸内菌叢の変化を図2に示すが、有益菌である*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*は摂取開始1～2週間目に増加し、有害菌である*Clostridium perfringens*、*C. difficile*は減少した。

【0040】この結果、総菌数に占める*Bifidobacterium*の割合は49. 5%（摂取開始直前）から62. 5%（摂取2週間後）と増加した。

【0041】また、各被験者の摂取開始直前と摂取2週

水抽出物を加えた5つの試料の乳酸菌増殖促進効果を試験例1と同様の方法で調べた。

【0035】結果を表3に示すが、酸処理物および消化酵素処理物の乳酸菌増殖促進効果は対照と全く同じであった。

【0036】

【表3】

間後の*Bifidobacterium*の菌数の変化を図3に示すが、1名を除く7名に菌数の増加が認められた。

【0042】このように、本発明の乳酸菌増殖促進物質は腸内有用菌である*Bifidobacterium*属および*Lactobacillus*属細菌を増加させ、有害菌である*Clostridium*属細菌を減少させる腸内菌叢改善効果を有することが示された。

【0043】試験例4

実施例1の水抽出物を分画分子量10000の限外濾過膜を用いて、分子量10000以下の低分子画分と10000を越える高分子画分に分けて各画分の乳酸菌の増殖に与える影響について調べた。試験は試験例1の方法で行った。

【0044】その結果を表4に示すが、低分子画分は全ての乳酸菌の増殖を促進したのに対して高分子画分は2株のみが効果を示し、その程度は非常に弱いものであった。

【0045】

【表4】

水抽出物の高分子画分、低分子画分の乳酸菌に対する増殖促進作用

供試菌株	被験試料	
	高分子画分	低分子画分
<i>Bifidobacterium bifidum</i> E-319	-	(+)
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM 1217	+	++
<i>Bifidobacterium infantis</i> JCM 1222	-	+
<i>Bifidobacterium adrentis</i> E-2986	-	++
<i>Bifidobacterium breve</i> S-1	-	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	-	(+)
<i>Lactobacillus casei</i> JCM 1134	+	++

【0046】このことから、実施例1の水抽出物に含まれる乳酸菌増殖促進因子は分子量1万未満の低分子物質であると推定される。

【0047】

【発明の効果】本発明の効果を挙げれば以下の通りである。

- 1) 本発明の乳酸菌増殖促進物質を摂取することにより、ビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属に属する細菌を選択的に増殖させ、有益菌が優勢な腸内フローラを形成することができる。
- 2) 粗抽出物として1日2、4g程度の摂取で腸内の有益菌を増やすことができる。
- 3) 本物質はカカオ豆特有の匂いがなく、無臭であるため各種食品に添加することができる。

4) 従来廃棄されていたカカオハスクから抽出するため安価に生産することができる。

5) 本物質は酸、消化酵素に安定であるため、活性を失うことなく有益菌の生息場所である大腸まで到達する。

6) 発酵乳の製造の際、本増殖促進物質を添加することにより発酵期間の短縮、発酵操作の簡略化等の効果が得られる。

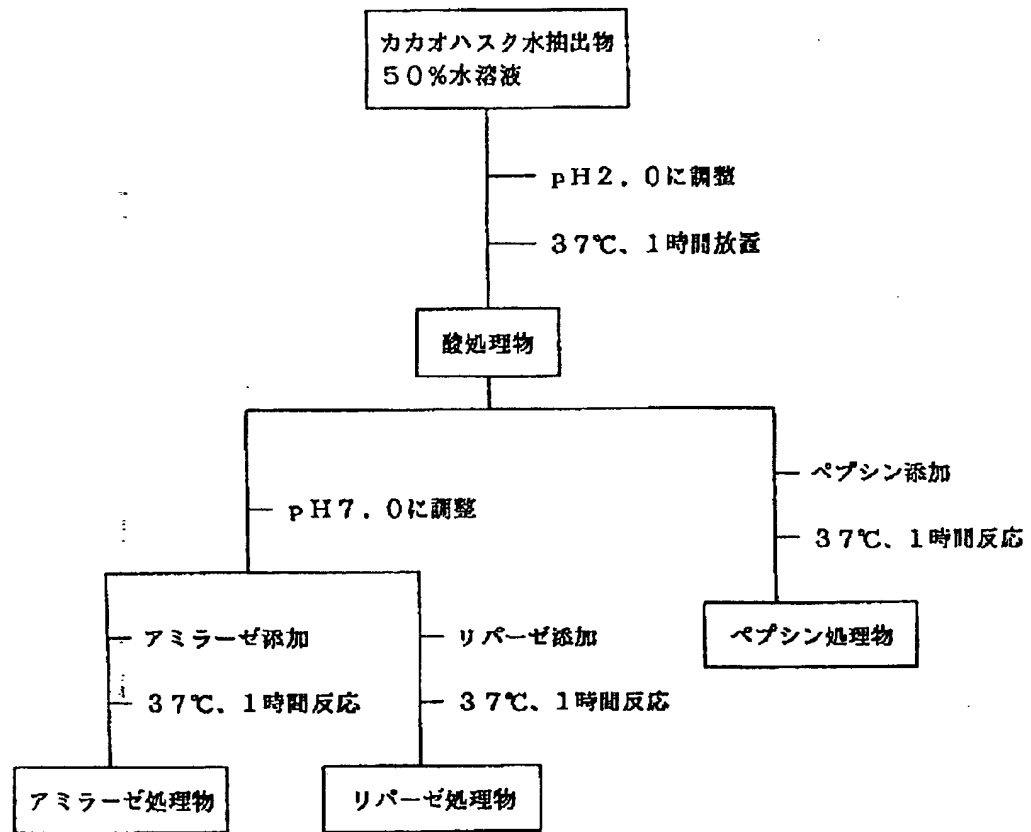
【図面の簡単な説明】

【図1】カカオハスク水抽出物の酸、消化酵素処理方法を示す処理系統図である。

【図2】カカオハスク水抽出物の摂取による腸内菌叢の変化を示す特性線図である。

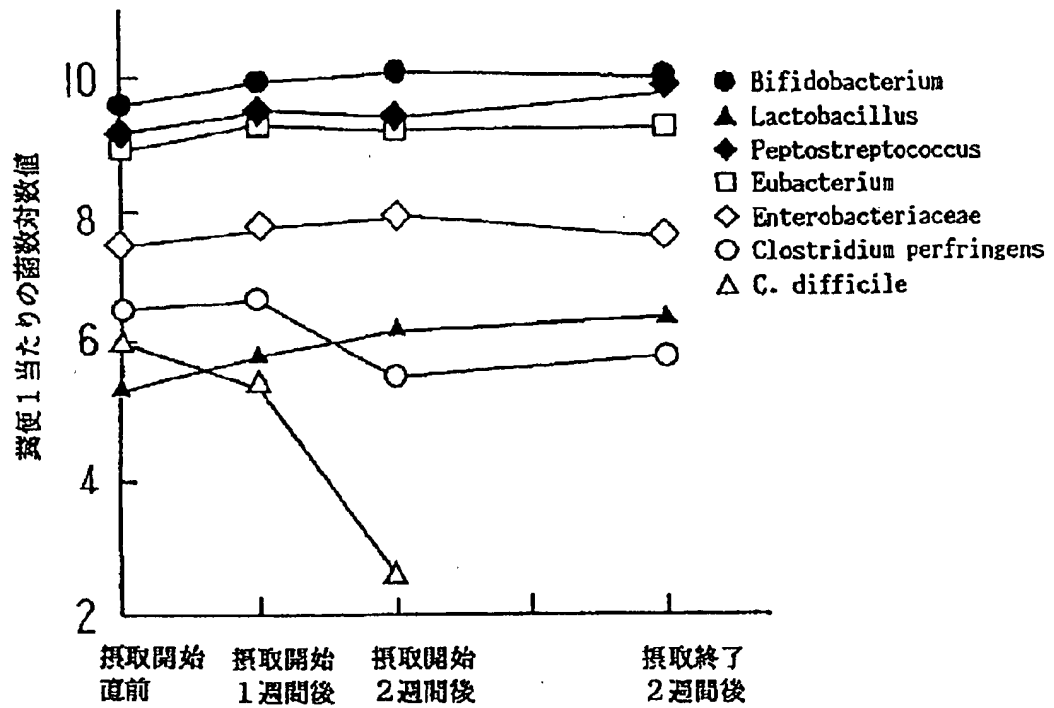
【図3】被験者8名のビフィズス菌数の変化を示す特性線図である。

【図 1】



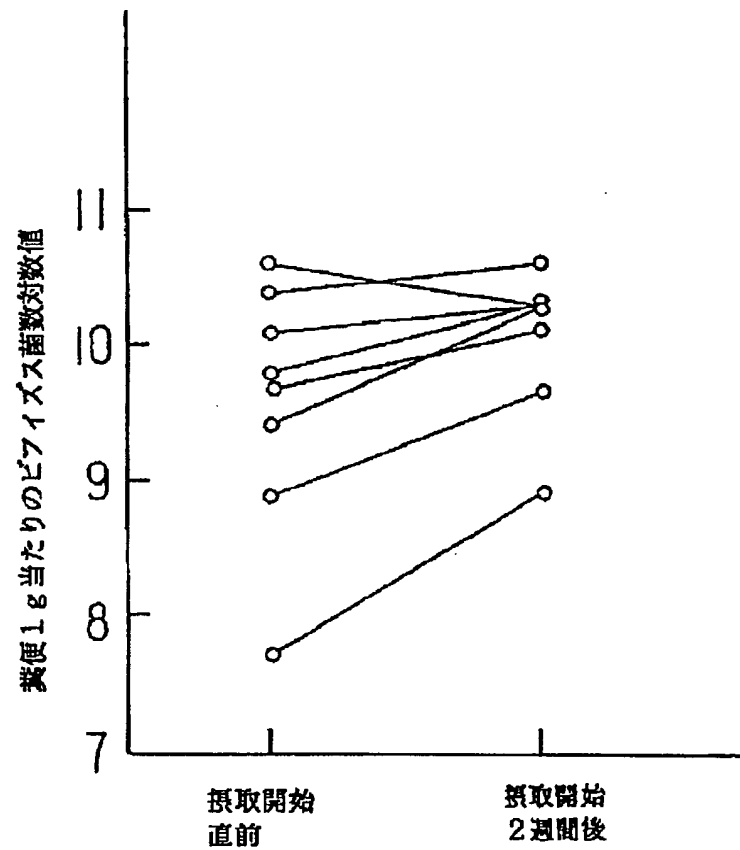
カカオハスク水抽出物の酸、消化酵素処理

【 図 2 】



カカオ水抽出物摂取による腸内菌叢の変化
(被験者 8 名の平均値)

【図 3】



被験者8名のビフィズス菌数の変化

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

(C12N 1/38

C12R 1:245)

(72) 発明者 久保 直樹

埼玉県浦和市沼影 1-15-13 ロッテ

しらさぎハウス

(72) 発明者 伊藤 雅範

埼玉県三郷市さつき平 1-2-1-803

(72) 発明者 上脇 達也

埼玉県浦和市白鯉 94-1-407